

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-254205
 (43)Date of publication of application : 11.10.1989

(51)Int.Cl. B01D 13/00
 A61K 35/14
 A61M 1/34

(21)Application number : 63-078245 (71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD
 (22)Date of filing : 01.04.1988 (72)Inventor : SATANI MASUO
 ISHIKAWA HAJIME
 SEKIGUCHI SADAMI

(54) VIRUS REMOVING UNIT

(57)Abstract:

PURPOSE: To prevent the contamination of bacteria and to remove virus with high efficiency without utilizing special motive force and to recover protein with high efficiency by connecting the flexible tubes which are used for the raw liquid introduction part and the filtrate takeout part of a virus removing filter respectively with a closed vessel and forming a closed circuit.

CONSTITUTION: A closed vessel 2 consisting of flexible material such as a bag made of soft polyvinyl chloride resin previously packed with raw liquid such as blood plasma, a filter 4 in which the porous membrane such as cuprammonium regenerated cellulose porous hollow fiber is molded to a module and a closed vessel 5 consisting of the same flexible material for storing filtrate are successively arranged to the vertical direction via a flexible tank 3. As a result, hydrostatic pressure is generated in the circuit and the raw liquid is filtered by utilizing this hydrostatic pressure and adding the pressure to the filter 4. The filtrate such as blood plasma free from virus is obtained in the closed vessel 5.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平1-254205

⑬ Int. Cl.

B 01 D 13/00
A 61 K 35/14
A 61 M 1/34

識別記号

310

庁内整理番号

G-8014-4D
Z-8213-4C

⑭ 公開 平成1年(1989)10月11日

7819-4C審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ウィルス除去ユニット

⑯ 特願 昭63-78245

⑰ 出願 昭63(1988)4月1日

⑱ 発明者 佐谷 満州夫 東京都千代田区有楽町1丁目1番2号 旭化成工業株式会社内

⑲ 発明者 石川 元 東京都千代田区有楽町1丁目1番2号 旭化成工業株式会社内

⑳ 発明者 関口 定美 北海道札幌市南区真駒内上町5-6-3 北海道赤十字血液センター

㉑ 出願人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

明細書

1. 発明の名称

ウイルス除去ユニット

2. 特許請求の範囲

蛋白質は透過するがウイルスの透過を阻止する多孔膜で構成されたフィルターの元液導入部及び濾液取出部の夫々に、可撓性材料からなるチューブを介して、夫々に可撓性材料からなる密閉容器を連結してなる閉回路で構成された、元液中からのウイルスを除去する、ウイルス除去ユニット

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は血液中、又は血漿中のウイルスを除去する為のユニットに関するものである。

本発明の好ましい適用例としては、例えば下記のような用途が挙げられる。

(i) 献血時の採血セットにおいて、又は血液センターや或いは病院等の採血現場において血漿と血漿を分離した後の血漿中のウイルスを除去したウイルスフリー血漿の提供。

(ii) 輸血用の回路において、輸液中のウイルスを除去したウイルスフリー輸液の提供。

(iii) 血漿分画製剤用の原料血漿としてウイルスフリーの原料血漿を得る為のウイルス除去。

(iv) 検査用標榜試薬用の血液、血漿をうるためのウイルス除去。

(v) 遺伝子工学等で使用される人血清、牛血清、の培地をうるのにウイルスフリーの人血清、牛血清をうるためのウイルス除去。

(vi) 臨床における血液の体外循環治療等において血液、血漿中のウイルスを除去してウイルスフリーの血液、血漿をうるためのウイルス除去。この他本発明は医学、産業、生化学等の分野においてウイルスフリーの血液、血漿を得るためのユニットとして広く利用出来る。

(従来の技術)

血液、血漿、製剤、蛋白質水溶液から細菌を除去する方法として除菌フィルターによる滤過方法が採用されてきた。また上記の血液、血漿、製剤、蛋白質の水溶液中のウイルスを不活化する方法と

しては、加熱法、紫外線照射法または溶剤を添加して不活性化する Solvent Detergent 法がある。しかしこれらの方法ではウイルスの残がいが残づたり、有効な蛋白質が変成してしまう。中空糸を用いてウイルスを除去する方法としては、特開昭60-142861号公報に示された実質的に均一な5μm以上の実効膜厚を有し、特定の内部構造を持つポリエチレン中空糸膜を用いる方法が記載されている。しかしこれらの方法でもウイルス除去は出来るが、共存する有効な蛋白質が効率よく透過しない。

またここで用いられている方法ではチューブポンプを用いた動力使用である。一方使われた回路はオープン状態であるため細菌やウイルスの混入の懼れが考えられる。

(本発明が解決しようとする問題点)

血漿中のウイルスを除去して蛋白質を回収する場合、ウイルス除去の要求達成レベルは、蛋白質の回収のそれに比べて格段に高い。多孔膜を用いてウイルス除去を行う場合、蛋白質の透過率は
 ((濾液中の蛋白質濃度 / 元液中の蛋白質濃度) × 100) は 1 ~ 99 % の範囲での議論が一般的であるのに対し、要求されるウイルスの除去率は $(1 - (\text{濾液中のウイルス濃度} / \text{元液中のウイルス濃度}) \times 100)$ が 99.99 % ~ 99.999999 % である。そこでまずウイルスの除去に着目するならば、膜の孔径を小さくするか、孔径の代替値としてポリスチレンラテックス粒子のような特定粒子の阻止率を大きくすることによつてウイルスの除去率を向上させることであろう。しかしウイルスの除去率を向上させるに伴なつて蛋白質の透過率が低下すると共に、透過速度(滤過速度)が低下する。即ちウイルス除去前後における蛋白質組成の変化が大きくなるといった問題が生じる。

本発明は蛋白質水溶液特に血漿からウイルスを高効率で除去すると共に蛋白質を高効率で回収するという相反する問題を細菌で汚染されことなく、かつ特別に動力を用いることなく簡易な手段で解決するウイルス除去ユニットを提案するものである。

(問題を解決するための手段)

本発明の最大の特徴は、採血或いは輸注が可能な回路内部に直接ウイルス除去器を連結し流体の流れる回路として閉回路を形成している点にある。

本発明における閉回路とは、回路内に存在する流体が事实上回路外の流体と相互に流入しない回路を意味する。従つて回路の以外からの流体の流入入のためには回路の一部を切断するか或いはせん孔することを必要とする。

本発明のウイルス除去ユニットの使用に際しては、全血又は血漿等の元液を充填した可撓性材料からなる容器、フィルター、濾液を貯蔵するための可撓性材料からなる容器を、可撓性チューブを介して順次垂直方向に配置する。この結果、回路内に静水圧が発生し、この静水圧を利用してフィルターに圧力を加えることが可能になり、元液はフィルターにより滤過される。濾液は最下部に配置された容器内に貯えられる。

チューブは通常数mm~十数mm程度の内径 5.0 mm ~ 2 mm 程度の長さのものが一般に用いられる。

容器は、袋状、ピン状その他形態は問わない。

容量は一般に數十ml~数百ml のものが用いられる。

回路を密閉系にすることによつてウイルス除去後の濾液が細菌等で再汚染されることが防止できる。この回路を構成する材料としては高圧蒸気滅菌可能であることが好ましい。

容器やチューブは可撓性材料で構成されていることが必要である。可撓性材料として合成樹脂が好ましい。更には、ガラス転移温度が 37 ℃ 以下の合成樹脂が好ましい。このような合成樹脂として例えば軟質塩化ビニル樹脂、またはポリエチレン樹脂製のシートまたはフィルムで出来た袋やチューブあるいは薄肉のピン状容器が挙げられる。可撓性材料を用いることの特徴は元液が元液バッフルから連結管を通してフィルターを通り最下部の容器に階下していく際密閉回路における液の流动による圧力変動に伴ない可撓性材料では自由に変形して圧力をコントロールするため液量が最後まで流れ得ることが可能となる。

蛋白質共存下でのウイルス除去のためには、大細菌ファージ φ X 174 の阻止係数(T) が 2 以上

でかつ5重量%のヒト血清アルブミン水溶液の透過速度(J_p)と純水の透過程度(J_w)との比(J_p / J_w)が1/50以上の高分子多孔膜からなるフィルターに、血液、血清、蛋白質水溶液を通じてその中に存在するウイルスをこの膜で捕捉することが特に好ましい。

ここで阻止係数は次式で定義される。

$$\text{阻止係数} = \frac{\text{透過程前元液中の被透過程物質の濃度}}{\text{透過程後液中の被透過程物質の濃度}}$$

(T)が2以上の場合は、ウイルス種とは無関係にウイルスの除去率は99%以上となる。除去前の血液、血漿、蛋白質水溶液中のウイルス濃度が極めて低い場合には(T)が2以上であればウイルス除去の目的は達成される。しかし、利用範囲を一層広げるためには(T)が3以上であることが好ましく、4以上がより好ましい。ウイルスを除去すると同時に血液、血漿、蛋白質を効率よく回収するためには J_p と J_w との比を考慮することが必要である。本発明者らは、 J_p / J_w の異なる各種の高分子多孔膜を用いて検討を行った結果、

J_p / J_w が大きくなるにつれて、ウイルスの除去と血液、血漿、蛋白質水溶液の回収が短時間に行なわれると共にウイルス除去前後において血液、血漿、蛋白質水溶液の組成変化が少なく、しかもこれらの経時変化を小さくすることができるを見出した。かかる観点から J_p / J_w は1/50以上であることが好適であり、さらに好ましくは1/20以上、より好ましくは1/10以上である。

J_p / J_w が1/50未満ではウイルス除去率も低く、また血液、血漿、蛋白質水溶液の蛋白質の回収の効率が低いのみならず、時間の経過と共に高分子多孔膜表面に蛋白質のケーキ層が形成され、一層これらの効率が低下する。

高分子多孔膜のアルブミン透過率(アルブミン5重量%を溶解した水溶液を高分子多孔中空糸で透過程した際に透過程10分後のアルブミン透過率)が60%以上の場合には蛋白質のケーキ層が形成され難くなり、血液、血漿、蛋白質水溶液中の蛋白質の回収率が70%以上、ウイルスの除去率99.99%以上が達成可能となる。

高分子多孔膜のアルブミン吸着率(アルブミン濃度500ppmの0.9重量%の生理食塩水溶液からの25%におけるアルブミン吸着量)が10μg/ml以下の場合にはウイルス除去前の血液、血漿、蛋白質水溶液の蛋白質濃度が1重量%以上であつても、ウイルス除去と蛋白質回収の効率の経時的低下を防止するもので好ましい。

高分子多孔膜の平均孔径は、水透過程による平均孔径として0.01~0.3μmが好ましい。多孔膜の形態は、平膜、チューブ状膜、中空糸等が挙げられる。膜厚は5~100μmが好ましい。中空糸の場合、内径は100μm~1mmが好ましい。高分子膜の素材としては、例えばポリビニルアルコール、エチレン、ビニルアルコール共重合体、再生セルロース、ポリウレタン、ムコ多糖類、低置換度酢酸セルロース、低置換度硫酸セルロース、硫酸セルロース、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、等が挙げられる。一般にはアルブミン吸着量の少ない親水性高分子や、疎水性高分子に親水性を施したもののが好ましく、銅アンモニ

ア法再生セルロース、ポリビニルアルコールを中心とする高分子、部分けん化セルロースがより好ましい。銅アンモニア再生セルロース溶液を紡糸用原液とし、紡糸過程内で中空糸の内壁部と外壁部とからミクロ相分離を起こさせ、その後凝固させる方法で層状構造をもつた中空糸壁部で構成された中空糸は、ウイルスの除去率が高く蛋白質の透過率が高いので最も好ましい。

血液、血漿、蛋白質水溶液としては特に限定されるものはないが、ヒトや家畜の血液、血漿やヒトや家畜血漿由来の製剤や蛋白質を溶解した水溶液が本発明では好適に採用されている。

本発明は、血漿とウイルスとの濃度の比が10以上(重量比)の血漿からウイルスを除去する際に特に有効である。また各種蛋白質等が共存しても差しつかえない。

ウイルス除去に際して、液を膜面に沿つて並行に流しながら透過程を行う方法(並行透過程)と、液を(ほぼ)静止状態下で膜に接触させて透過程を行う方法(垂直透過程)がある。本発明の目的を効率

よく達成するうえからは、垂直輸送が望ましい。除去すべきウイルスは限定されない。本発明はエイズウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、成人「細胞白血病ウイルス(HTLV-1)」、サイトメガロウイルス、單純ヘルペスウイルス等血液、血漿を介して感染するウイルスの除去に適用できる。

ウイルスの種類に応じて高分子多孔膜の平均孔径を適量設定することにより最適の効果が達成される。例えば、血漿もしくは培養液中のHIVを除去する場合には、水滲過速度法による平均孔径を $0.15\sim0.11\mu\text{m}$ 、好みしくは $0.03\sim0.11\mu\text{m}$ 、より好みしくは $0.05\sim0.11\mu\text{m}$ とするのがこのましい。またHBVAを除去する場合には、水滲過速度法での平均孔径 $0.015\sim0.02\sim0.05\mu\text{m}$ 好みしくは $0.02\sim0.05\mu\text{m}$ とするのが好みしい。

かくして得られたウイルスフリーの液体を保存袋又は保存ビンに充填し、これを凍結等にとつて安定に保存状態にすることも可能である。この際保存袋又は薄肉の保存ビンは閉回路内に組み込まれていることが細菌汚染防止点から望ましい。

以下本発明に用いた高分子多孔膜の実施例を詳述し併せてウイルス除去性能、蛋白質透過性能について、比較例との比較結果を示す。

実施例1

セルロースクリンター(粘度平均分子量 2.43×10^6)を公知の方法で調整した鋼アンモニア溶液中に8重量%の濃度で溶解し紡糸原液とした。その紡糸原液を盤状紡糸口の外側紡糸口(外径2mm)より2.0 ml/分で、一方中空剤としてアセトン4.5重量%／アンモニア0.575重量%／水54.425重量%の混合溶液を中央紡出口(外径0.6mm)より1.4 ml/分でそれぞれアセトン4.5重量%／アンモニア0.575重量%／水54.425重量%の混合溶液中に直接吐出、10m/分の速度で巻き取つた。吐出直後の透明青色状の纖維状物は次第に白色し、ミクロ相分離を生起し、ひきつづき凝固が起こり、纖維としての形状が形成された。その後、2重量%の硫酸水溶液に浸潤し、その後水洗いした。湿润状態にある多孔性中空纖維をメタノールで、中空纖維内部の水を置換し、その後

真空乾燥した。この様にして得られた鋼アンモニア再生セルロース多孔性中空纖維は、内径 $250\mu\text{m}$ 、膜厚 $2.5\mu\text{m}$ 、水流速平均孔径 35.3nm であつた。この中空糸の $\phi \times 174$ の阻止係数は3.9であり J_p/J_w は $1/15$ であり、アルブミン透過率9.8%で、アルブミン吸着量は $9.4\mu\text{g}/\text{g}$ であつた。この中空纖維500本束ねてモジュールに成型した。B型肝炎陽性の全血を採血セットを用いて、血液保存液CPD液 2.8ml の入つた採血(親バツグ)に 200ml 採取し、 2500G で9分間遠心分離を行い濃厚赤血球液 140ml と新鮮液状血 90ml を採血後3時間内に子バツグに分離した。子バツグに分離された新鮮液状血漿を図-1のようにヘッド圧 2m の高さに吊るし、動力を用いず再生セルロース多孔性中空糸で出来たモジュール(水流速平均孔径 35.3nm)で滲過し、滲液を子バツグに3.5分間で回収した。ただし、この閉回路を構成する採血バツグ(親バツグ)、血漿バツグ(II)、連絡管、ウイルスフリー血漿バツグ(IV)はいずれも軟質ポリ塩化ビニール樹脂で構成され、また閉回路はあらか

じめ滅菌処理がなされていた。B型肝炎ウイルス(HBV)DNA量を測定し除去率を算出した。この除去率はウイルスの除去率とは一致せず、理論的にはウイルスの阻止係数より小さいことが予想される。大腸菌ファージや動物性ウイルスを用いた滲過実験の結果から推定すると、DNAの阻止係数に約2を加えた値がHBVの阻止係数に対応すると判断される。又滲液中の蛋白回収率及びアルブリソングロブリソングループ比(A/G比)を測定した。

比較例として、 $\phi \times 174$ 阻止係数が4.0であり J_p/J_w が $1/110$ である。ポリスルホン製(分子量 3×10^6)の限外滲過膜を用いて、約120分間かけて同様に滲液を採取し、HBVのDNA量及び蛋白回収率、A/G比を測定した。表-1にその測定結果を示す。なお滲液A/Cは臨時にわずかに上昇する傾向が認められたが、その程度は実用上問題とならない程度で3.4~3.7の間であつた。一方ポリスルホンではこの値は3.5~6.3にわたって変化した。

実施例2

セルロースリントーを精製し、これを公知の方法で調整した銅アソモニア溶液（銅／アソモニア／水の重量比が3.1/6.8/90.1）中に7.3重量%で溶解し、この溶液を滤過後脱泡し、紡糸原液とした。この紡糸原料を 25.0 ± 0.1 °で制御しつつ環状紡糸口の外側紡出口（外径2mm、内径12μm）より2.0 ml/分で吐出された。一方水／アセトン／アソモニア比100.0/68.0/0.99（重量比）で厳密に組成が制御された溶液（以外中空剤と略称）を採用し、これを 25.0 ± 0.1 °で速度制御しつつ、中央紡出口（径0.6 mm）より4.5 ml/分で吐出させた。吐出された糸状物を水／アセトン／アソモニア比、100.0/70.0/1.0（重量比）で厳密に組成が制御され、 25.0 ± 0.1 °の溶液中に直接導き、該溶液中で6.9ml/分の速度で巻き取った。なお、吐出直後の透明青色状の織維状物は次第に白色化し、ミクロ相分離を生起し、引きつづいて凝固が起こり、纖維としての形状が確認されていた。その後、 20.0 ± 0.1 °で2重量%の硫酸水溶液で定長で再生し、その後水洗し、水を徐々にメタノールに置換した。

メタノールに置換後の中空糸を20.0 °で真空乾燥した。かくして得られた中空糸の外径は200μm、膜厚は32μm、内径は228μmであった。該中空糸の内外壁面の走査型電子顕微鏡観察によれば、両壁面は何れもネットワーク構造をとり、また、該ネットワークが積層した積層構造を示す。粒子直径 $2S$ は0.38μm、 $2T$ は50nm、 P_{re} は4.8%であった。 $\phi \times 174$ の阻止係数は4.2であり、 J_p/J_w は1/8でありアルブミン透過率は99.9%以上で、アルブミン吸着量は9μg/mlであった。

該中空糸を500本束ねて有効過面積を約0.03m²の円筒状の滤過用モジュールを組立てた。該モジュールを図-2の採血回路内に組み入れ回路全体を閉回路とした。組立て後高圧蒸気滅菌法によること後、実施例1と同様に採血バッグ（既バグ）に全血200mlを採血した。図2の血液を含んだ回路全体を遠心分離機に設置し、2500Gで9分間遠心分離を行ない、次いで採血バッグより血漿バッグへ公知の方法で約90mlを移動させた。移動

後、採血バッグと血漿バッグ①を連結しているチューブを溶融切断することにより、幅厚赤血球液140mlを含んだ採血バッグを分離した。血漿バッグ①の血漿を実施例1と同様にヘッド圧2°の高さから動力を用いずに滤過し、滤液をウイルスフリー血漿バッグ②に20分間で回収した。ただし、この閉回路を構成する採血バッグ、血漿バッグ①、連結管、ウイルスフリー血漿バッグ②はいずれも軟質ポリ塩化ビニル樹脂で構成されている。HBVのDNAの阻止率は99.99%以上で、蛋白質の透過率は98.0%、アルブミン／グロブリンの濃度比（A/G比）は滤過前が3.3で滤過後は3.5でありA/G比の経時変化は認められなかつた。また、滤液の補体活性はほとんど認められなかつた。

表-1 ウィルス除去器に組みこんだ再生セルロース多孔性中空糸膜及びポリスルホネット滤過膜との性能比較表。

| | 再生セルロース多孔性中空糸膜 | ポリスルホネット滤過膜 第1滤過膜 | |
|---|--------------------|----------------------|---------------------|
| H B V · D N A E 量 | 滤過前血漿 (Pg/25μl) | 2000 | 1000 |
| | 滤過後血漿 (Pg/25μl) | <0.78 検出限界 以下 | <0.78 検出限界 以下 |
| | 阻止率(%) | 99.95以上 | 99.1以上 |
| 蛋白 透 明 性 | 滤過前總蛋白 量(mg/ml) | 64.3 | 67.7 |
| | 滤過後總蛋白 量(mg/ml) | 60.1 | 20.8 |
| | 回収率(%) | 94 | 31 |
| | 滤過前 A/G比 | 3.3 | 2.7 |
| | 滤過後 A/G比 | 3.7 | 5.8 |

(効果)

本発明による回路内にウイルス除去器が連結された閉回路を用いて、例えば血漿を処理すれば、血漿中の蛋白質（アルブミン、グロブリン、血漿凝固因子、抗体等）の変性を惹起することなく、また濾過後の蛋白質の回収率も高い状態で、ウイルスが高率に除去され、感染性のない安全な血漿を得られる。

本発明の効果としては①ウイルス除去を必要とする滤過現場において、ウイルス除去器をその都度連結する必要はなく、単に液の入ったバッグを上部に吊るし、ウイルス除去器及び受けのバッグを下部において、ヘッド圧だけで、特別に加圧のための動力を必要とせずに上部のバッグに入つた液がウイルス除去器で滤過され、滤液が下部の受けバッグに入る仕組みになつており、極めて簡単で、全く習熟を必要とせず、かつ回路を組み立てる時のミスが発生しにくい。②このウイルス除去器の連結されたウイルス除去回路は閉回路になつており、回路全体が滅菌されているので、使用す

る現場では細菌やウイルスの混入はない。③短時間でウイルスを除去することが出来、有用な蛋白質の回収率も高く、また蛋白質の変性もない。

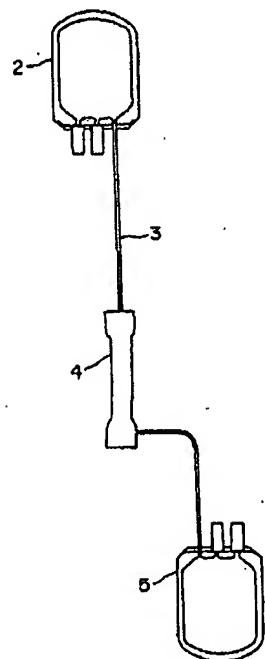
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施態様を示す説明図、第2図は本発明のウイルス分離器を内蔵した採血回路の一例を示す。

- 1 採血バッグ(既バッグ)
- 2 血漿バッグ(1)
- 3 連結管
- 4 ウイルス除去器
- 5 ウイルスフリー血漿バッグ(2)

特許出願人 旭化成工業株式会社

第1図



第2図

